

114

0.3 C
14

PATENT

Customer No. 22,852

Attorney Docket No. 02481.1761-00

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

Birgit JORDAN et al.

Serial No.: 09/989,188

Filed: November 21, 2001

For: PROCESS FOR SCREENING
CHEMICAL COMPOUNDS FOR
MODULATING THE INTERACTION
OF AN EVH1 DOMAIN OR A
PROTEIN HAVING AN EVH1
DOMAIN WITH AN EVH1 BINDING
DOMAIN OR A PROTEIN HAVING
AN EVH1 BINDING DOMAIN, AND
A PROCESS FOR DETECTING
SAID INTERACTION

)
)
) Group Art Unit: Unassigned

)
) Examiner: Unassigned

Commissioner for Patents and Trademarks
Washington, DC 20231

CLAIM FOR PRIORITY

Sir:

Under the provisions of Section 119 of 35 U.S.C., Applicants hereby claim the
benefit of the filing date of German Patent Application Number 100 58 596.5, filed
November 25, 2000, for the above identified United States Patent Application.

FINNEGAN
HENDERSON
FARABOW
GARRETT &
DUNNER LLP

1300 I Street, NW
Washington, DC 20005
202.408.4000
Fax 202.408.4400
www.finnegan.com

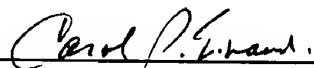


In support of Applicants' claim for priority, a certified copy of the priority application is filed herewith.

Respectfully submitted,

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,
GARRETT & DUNNER, L.L.P.

Dated: January 25, 2002

By: 
Carol P. Einaudi
Reg. No. 32,220

FINNEGAN
HENDERSON
FARABOW
GARRETT &
DUNNER LLP

1300 I Street, NW
Washington, DC 20005
202.408.4000
Fax 202.408.4400
www.finnegan.com



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 58 596.5

Anmeldetag: 25. November 2000

Anmelder/Inhaber: Aventis Pharma Deutschland GmbH,
Frankfurt am Main/DE;
Vasopharm Biotech GmbH, Würzburg/DE.

Bezeichnung: Verfahren zum Screening von chemischen
Verbindungen zur Modulierung der Wechselwirkung einer EVH1-Domäne oder eines Proteins mit einer EVH1-Domäne mit einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne sowie ein Verfahren zum Nachweis besagter Wechselwirkung

IPC: C 07 K 7/06

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 31. Mai 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hiebing

- 5 Verfahren zum Screening von chemischen Verbindungen zur Modulierung der Wechselwirkung einer EVH1-Domäne oder eines Proteins mit einer EVH1-Domäne mit einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne sowie ein Verfahren zum Nachweis besagter Wechselwirkung
- 10 Die Erfindung betrifft Verfahren zur Identifizierung einer chemischen Verbindung, welche die Wechselwirkung einer EVH1-Domäne oder eines Proteins mit einer EVH1-Domäne und einer EVH1-Bindedomäne oder eines Proteins mit einer EVH1-Bindedomäne insbesondere zwischen VASP oder einem VASP-Derivat und Zyxin oder einem Zyxinderivat modulieren kann, sowie ein Verfahren zum Nachweis
- 15 dieser Wechselwirkung.

- Die Wechselwirkung von Proteinen mittels EVH1-Domänen und EVH1-Bindedomänen spielt eine bedeutende Rolle insbesondere bei Signaltransduktionswegen, die beteiligt sind bei der Adhäsion von Zellen an
- 20 Gewebeoberflächen und deren Motilität, der Änderung der Gestalt von Zellen und ihrer Aggregation insbesondere der Aktivierung von Blutplättchen und Lymphozyten. Solche Vorgänge wirken möglicherweise bei der Entstehung und dem Verlauf einer Vielzahl von Krankheiten ursächlich mit, insbesondere beispielsweise bei
- inflammatorischen Erkrankungen, Erkrankungen der Blutgefäße, des
- 25 Herzkreislaufsystems und seiner Organe oder bei neoplastischen Zell- und Gewebsveränderungen wie Krebs .

- Es gibt eine Vielzahl von Proteinen, welche eine EVH1- oder eine EVH1-Bindedomäne enthalten. Ein Protein mit einer EVH1-Bindedomäne ist beispielsweise
- 30 Zyxin, während VASP beispielsweise ein Protein mit einer EVH1-Domäne ist. Die Domäne eines Proteins ist ein dreidimensionaler Bereich eines Proteins oder eine Proteinoberfläche, die von mehreren Abschnitten einer Peptidkette gebildet werden kann und sich als kompakter Bereich eigenständig falten kann. Einer EVH1(Ena-VASP-Homologie)-Domäne liegt ein hochkonservierter Sequenzabschnitt von etwa

115 Aminosäuren Länge zugrunde, der in allen Proteinen der Ena-VASP-Familie vorkommt und für ihre korrekte subzelluläre Lokalisation durch Wechselwirkung mit den jeweiligen EVH1-Bindeproteinen verantwortlich ist. Die EVH1-Domäne besteht aus sieben β -Faltblättern und einer C-terminalen α -Helix, die in einer charakteristischen "β-barrel"-Struktur gefaltet sind. Sie weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Pleckstrin-Homologie(PH)- und zu Phosphotyrosin-Bindungs(PTB)-Domänen auf. Die EVH1-Domänen der Ena/VASP-Proteinfamilie erkennen in den verschiedenen EVH1-Bindeproteinen prolinreiche Peptidsequenzen mit einem FPPPP-Kernmotiv, die in Form einer Polyprolin-Helix vom Typ II gefaltet sind. EVH1-Bindeproteine mit solchen FPPPP-Sequenzmotiven sind z.B. die zytoskelettassoziierten Proteine Zyxin und Vinculin oder das Oberflächenprotein ActA des fakultativ intrazellulären Bakteriums *Listeria monocytogenes*. Zyxin und VASP wechselwirken aufgrund der Interaktion der EVH1-Domänen von VASP und der FPPPP-Motive in der EVH1-Bindedomäne von Zyxin. VASP steht als Abkürzung für "Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein". VASP wird in fast allen Säugerzellen exprimiert und stellt dort ein Substrat der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen dar. Homologe Proteine zu VASP bilden zusammen mit letzterem die Ena/VASP-Proteinfamilie und konnten wie z.B. das Ena-Protein in *Drosophila* oder die Mena- und Evl-Proteine in der Maus nachgewiesen werden. Besonders hohe Konzentrationen an VASP finden sich beim Menschen in kardiovaskulären Zellen, insbesondere in Thrombozyten, Endothelzellen, in glatten Muskelzellen und in Neointimazellen. In kultivierten Zellen findet sich VASP assoziiert mit Zell-Matrix-Kontaktstellen (fokalen Adhäsionspunkten), Zell-Zell Kontakten, dem Aktinfilamentsystem und dynamischen Membranstrukturen, z.B. dem Leitsaum beweglicher Zellen. Viele experimentelle Daten belegen, daß VASP als Adaptermolekül Profilaktin an Orten mit den Zytoskelettproteinen Zyxin und Vinculin oder mit dem Oberflächenprotein ActA in mit *Listeria spec.* infizierten Zellen bereitstellt. Das EVH1-Domänen bindende FPPPP-Motiv in den Proteinen Zyxin, Vinculin und ActA und die EVH1-Domäne in VASP wurden funktionell und auch strukturell mittels NMR-Strukturaufklärung charakterisiert. Funktionelle Untersuchungen belegen, daß VASP ein entscheidender Faktor für eine gesteigerte, ortsgebundene Aktinfilamentbildung und damit auch ein wichtiger Faktor für die Regulation von Zelladhäsion und Zellmotilität ist. VASP wirkt dabei in direkter Wechselwirkung mit anderen Proteinen wie

beispielsweise Zyxin, Vinculin oder Profilin. Dies konnte z.B. durch die Mikroinjektion von Peptiden, welche das Bindungsmotiv der VASP-Zyxin-Wechselwirkung enthalten, gezeigt werden. [Eine Übersicht hierzu in: Reinhard M, Jarchau T, Reinhard K, and Walter U. (1999) VASP. In : Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins (Eds., Kreis,T., and Vale,R.), Oxford University Press, Oxford, pp. 168 –171]. Aus diesen Gründen wird der Komplex zwischen VASP und Zyxin als neuartige potentielle Zielstruktur angesehen, um durch Entwicklung entsprechender diese Wechselwirkung modulierender Arzneimittel Erkrankungen mit pathologisch veränderter Zelladhäsion und Zellmotilität wie beispielsweise Arterienverkalkung, Gerinnungsstörungen und damit im Zusammenhang stehende Herz-Kreislaufkrankungen günstig beeinflussen zu können. VASP und Zyxin bzw. Homologe oder Derivate dieser Proteine, welche miteinander wechselwirken, können deshalb unter anderem dazu verwendet werden, chemische Substanzen zu identifizieren, die als therapeutische Wirkstoffe zur Behandlung von Herz-Kreislaufkrankungen eingesetzt werden können.

Bekannt ist eine Methode zum Nachweis der Wechselwirkung zwischen einer EVH1-Bindedomäne wie beispielsweise in Zyxin enthalten mit einer EVH1-Domäne wie beispielsweise in VASP enthalten als radioaktiver Festphasen-Assay oder Overlay-Assay, wobei die Detektion von Zyxin nach Übertragung auf eine Festphase mit oder ohne vorherige gelelektrophoretische Auftrennung durch radioaktiv markiertes VASP erfolgt. (Reinhard et al. PNAS 92, 7956 – 7960, 1995; Reinhard et al. FEBS Lett. 399, 103 – 107, 1996). Dieses Verfahren ist aufgrund seines Formats und seiner radioaktiven Detektion nicht für ein Nachweisverfahren mit hohem Probendurchsatz (High-Throughput Screening = HTS) geeignet. Die verwendete radioaktive Markierungsmethode beschränkt die Anwendungsbreite, eine gelelektrophoretische Auftrennung ermöglicht wegen der aufwendigen Trennschritte keine Verwendung in automatisierten Screeningverfahren und erzeugt darüberhinaus Probleme hinsichtlich der Spezifität des Nachweises.

30

In WO 98/01755 werden dem VASP ähnliche Proteine (Mena, Evl) offenbart, die nicht aus Menschen stammen. Diese Proteine sind für den Aufbau eines Screeningmodells weniger geeignet, da sie die nachzubildende Zielstruktur aus

vorzugsweise humanen Komponenten für pharmazeutische Screeningzwecke nur unvollkommen wiedergeben.

- Die Verwendung von Lanthanid-Chelaten als Fluoreszenzmarkierung und die
- 5 Verwendung zeitaufgelöster Fluoreszenzmessung mittels dieser Fluoreszenzmarkierungen für beispielsweise HTS (High Througput Screening) wird von Wallac Oy (Finnland) in WO 97/29373 und WO 98/15830 offenbart. Es liegen bislang keine publizierten Ergebnisse vor zur Benutzung von
- Fluoreszenzmarkierungen für die Analyse der Wechselwirkung zwischen einer
- 10 EVH1-Bindedomäne wie beispielsweise in Zyxin enthalten mit einer EVH1-Domäne wie beispielsweise in VASP enthalten, die insbesondere für eine Verwendung in Screeningverfahren geeignet wären.

- Die Aufgabe wird daher in der Entwicklung eines Screeningverfahrens zur
- 15 Identifizierung von chemischen Verbindungen gesehen, welche die Wechselwirkung zwischen einer EVH1-Bindedomäne wie beispielsweise in Zyxin enthalten oder eines Proteins mit einer EVH1-Bindedomäne mit einer EVH1-Domäne wie beispielsweise in VASP enthalten oder eines Proteins mit einer EVH1-Domäne modifizieren können. Dieses Screeningverfahren sollte sich für hohen Durchsatz eignen sowie
- 20 sicher, schnell, mit hoher Spezifität und zuverlässig auch im automatisierten Betrieb durchführbar sein. Darüberhinaus sollte in diesem Screeningverfahren eine für pharmazeutisches Screening relevante Zielstruktur mit vorzugsweise humanen Komponenten nachgebildet werden.

- 25 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung einer chemischen Verbindung, welche eine Wechselwirkung zwischen einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne und einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne moduliert, enthaltend die Verfahrensschritte:
- a) In-Kontakt-Bringen einer EVH1-Bindedomäne oder eines Proteins mit einer
- 30 EVH1-Bindedomäne mit einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne in Gegenwart einer zu untersuchenden chemischen Verbindung; Unter "In-Kontakt-Bringen" kann insbesondere die Abfolge der Schritte von Beschichten eines Trägers mit einer Domäne, Blocken/Waschen, Zugabe der

anderen Domäne (mit oder ohne Testsubstanz),/Inkubation bis einschließlich Waschen verstanden werden.

- b) Verwendung des Ansatzes gemäß a) zur Inkubation mit einem Antikörper, der Bindespezifität für eine EVH1-Bindedomäne oder ein Protein mit einer EVH1-Bindedomäne oder für eine EVH1-Domäne oder für ein Protein mit einer EVH1-Domäne oder für ein mit diesen Domänen oder Proteinen fusioniertes oder gekoppeltes Antigen hat;
 - c) Verwendung des Ansatzes gemäß b) zur Inkubation mit einem Antikörper, der den Antikörper aus Ansatz b) spezifisch binden kann und an dem eine biochemisch oder physikalisch-chemisch nachweisbare Markierung angebracht ist;
 - d) biochemischer oder physikalisch chemischer Nachweis der Markierung am Antikörper aus c) nach Inkubation gemäß c).
- 15 Die Modulation der Wechselwirkung kann zu einer Verstärkung der Bindung der Bindungspartner oder zu einer Abschwächung dieser Bindung führen. Die Verstärkung der Bindung der Bindungspartner zeigt sich beispielsweise an der Erhöhung der Affinität der beteiligten Domänen oder Proteine zueinander. Eine Erhöhung der Affinität gibt sich an der Erniedrigung der Affinitätskonstanten der beteiligten Bindungspartner zu erkennen. Die Affinitätskonstanten sind mit Standardmethoden der Biochemie bestimmbar. Solche Methoden sind beispielsweise offenbart in „Pingoud, A., Urbanke, K., Arbeitsmethoden der Biochemie; 1997; Gruyter Lehrbuch“ oder in „Wilson, K., Goulding, K. H., Methoden der Biochemie; 1991; Thieme flexible Taschenbücher“. Das analoge gilt für die
- 25 Abschwächung der Bindung der Bindungspartner. Ein Protein mit einer EVH1-Bindedomäne ist ein Protein, welches eine EVH1-Bindedomäne enthält. Ebenso ist ein Protein mit einer EVH1-Domäne ein Protein, welches eine EVH1-Domäne enthält.
- 30 Das Verfahren zur Identifizierung einer chemischen Verbindung wie vorstehend beschrieben erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform an einer Oberfläche, die aus einem festen Körper besteht. Es wird deshalb auch als Festphasen-Assay bezeichnet. Die Oberfläche des festen Körpers ist dabei in einer bevorzugten Ausführungsform mit einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-

Bindedomäne beschichtet, welche mit einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne wechselwirkt. Die Oberfläche des festen Körpers ist in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform mit einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne beschichtet, welche mit einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne wechselwirkt. Die so beschichteten Oberflächen können dann mit einem bezüglich der untersuchten Wechselwirkung inerten Reagenz oder Protein wie Rinderserumalbumin beschichtet werden. Auf diese so beschichtete Oberfläche wird die zu untersuchende chemische Verbindung aufgegeben, wobei sie in einem wäßrigen oder organischen Lösungsmittel gelöst sein kann. Der feste Körper kann aus unterschiedlichem Material wie Kunststoff, Glas oder Metall bestehen. Bevorzugt besteht der feste Körper aus einem organischen Polymer. In einer weiteren Ausführungsform besteht der feste Körper aus einem chemischen Material, das unlöslich in oder widerstandsfähig gegen organische Lösungsmittel, Säuren, Laugen oder wässrige Lösungen ist. Der feste Körper kann in unterschiedlicher Form aufgebaut sein. Beispielsweise kann er in einer bevorzugten Variante als Mikrotiterplatte sowie als Eppendorfgefäß, Glasröhrchen, Folie oder Mikrochip vorliegen. Der feste Körper kann aus nur einem oder mehreren Materialien oder Komponenten bestehen. Die Beschichtung der Oberfläche des festen Körpers mit einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne, welche mit einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne wechselwirkt, kann direkt am festen Körper durchgeführt werden. Es ist im Falle aus unterschiedlichen Materialien zusammengesetzter fester Körper auch möglich ein Trägermaterial separat von einem festen Grundkörper zu beschichten und das Trägermaterial nach der Beschichtung auf diesem festen Grundkörper aufzubringen, wobei dann das Trägermaterial und der feste Grundkörper zusammen den festen Körper bilden. Die Beschichtung der Oberfläche kann zuerst allein mit einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne erfolgen. Die Wechselwirkung mit einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne wird dann hergestellt, indem in einem zweiten Schritt eine EVH1-Domäne oder ein Protein mit einer EVH1-Domäne zu der mit der EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit der EVH1-Bindedomäne beschichteten Oberfläche zugegeben wird. In einer weiteren Ausführungsform wird die Oberfläche zuerst allein mit einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne beschichtet. Die Wechselwirkung mit einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein

- mit einer EVH1-Bindedomäne wird dann hergestellt, indem in einem zweiten Schritt eine EVH1-Bindedomäne oder ein Protein mit einer EVH1-Bindedomäne zu der mit der EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne beschichteten Oberfläche zugegeben wird. Zur Beschichtung der Oberfläche des festen Körpers
- 5 mit einer EVH1-Bindedomäne, einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne, einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne wird die Oberfläche des festen Körpers mit einer dieser Domänen oder Proteine inkubiert. Ebenso werden zur Herstellung der Wechselwirkung zwischen einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne und einer EVH1-Domäne oder
- 10 einem Protein mit einer EVH1-Domäne die eine Domäne oder ein Protein mit dieser Domäne mit der anderen Domäne oder einem Protein mit dieser anderen Domäne inkubiert. Der Überschuß an nicht-wechselwirkenden Domänen oder Proteinen mit den Domänen wird dann durch einen Waschschrift entfernt. Inkubieren bedeutet dabei, daß Proteine und Oberfläche über eine definierte Zeitspanne bei festgelegter
- 15 Temperatur und bestimmten Puffer- und Ionenkonzentrationen miteinander in Kontakt gebracht werden. Die Proteine können dazu in gepufferten und mit chemischen Zusätzen versehenen wäßrigen Medien gelöst oder suspendiert vorliegen.
- 20 Als Protein mit einer EVH1-Bindedomäne wird bevorzugt Zyxin oder ein Zyxinderivat verwendet. Grundsätzlich kann für die Verfahren der vorliegenden Erfindung jedes Protein mit einer EVH1-Bindedomäne verwendet werden. Die EVH1-Bindedomäne kann auch physikalisch getrennt von anderen Bestandteilen eines Proteins als isolierte Domäne oder als EVH1-Bindepeptid eingesetzt werden. Als EVH1-
- 25 Bindedomäne kann beispielsweise eine EVH1-Bindedomäne wie in Zyxin oder einem Zyxinderivat enthalten zur Anwendung kommen. Als Protein mit einer EVH1-Domäne wird bevorzugt VASP oder ein VASP-Derivat eingesetzt. Grundsätzlich kann jedes Protein mit einer EVH1-Domäne verwendet werden. Die EVH1-Domäne kann auch physikalisch getrennt von anderen Bestandteilen eines Proteins als
- 30 isolierte Domäne zur Anwendung kommen. Als EVH1-Domäne kann beispielsweise eine EVH1-Domäne wie in VASP enthalten verwendet werden.

Als VASP oder VASP-Derivat, Zyxin oder Zyxinderivat können grundsätzlich die entsprechenden Proteine oder deren Teile aus jeder Spezies eingesetzt werden.

Bevorzugt werden VASP und Zyxin oder Teile davon von Wirbeltieren wie der Maus und besonders bevorzugt die des Menschen verwendet. Aminosäuresequenzen für VASP sind offenbart bei Swissprot unter P50552 (Mensch) oder bei EMBL unter X98475.1 (Maus). Aminosäuresequenzen für Zyxin sind offenbart bei Swissprot unter Q15942 (Mensch) oder unter Q62523 (Maus). Die benötigten Proteine können entweder aus entsprechenden Geweben oder Zellen von Wirbeltieren wie zum Beispiel Blutplättchen isoliert werden oder in Wirtszellen oder Mikroorganismen wie beispielsweise Insektenzellen oder E. coli Zellen rekombinant hergestellt und aufgereinigt werden. Rekombinantes VASP wird z.B. aus Insektenzellen mittels Immunoaffinitätschromatographie aufgereinigt wie detailliert beschrieben in "Jarchau, T., Mund, T., Reinhard, M., U. Walter (1998) Purification and Assays of Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein. Methods in Enzymology Vol. 298, 103 - 113." Die EVH1-Domäne von VASP oder die EVH1-Bindedomäne von Zyxin werden z.B. rekombinant aus E.coli als Glutathion-S-Transferase -Fusionsproteine gereinigt wie in "Current Protocols in Molecular Biology, ed.: F.M. Ausubel, Wiley-Interscience (1987)" detailliert beschrieben.

Als Protein mit einer EVH1-Bindedomäne wird in einer bevorzugten Ausführungsform ein Zyxinderivat eingesetzt. Das Zyxinderivat besteht in einer bevorzugten Ausführungsform aus einem Fusionsprotein aus der Glutathion-S-Transferase, an deren C- Terminus die ersten 142 Aminosäuren des N-Terminus des Zyxin fusioniert worden sind. Als Glutathion-S-Transferase kann grundsätzlich die Aminosäuresequenz jeder Spezies verwendet werden. Bevorzugt werden Sequenzen von Mensch, Maus, Ratte oder Schistosoma japonicum verwendet. Solche Sequenzen sind beispielsweise in Swissprot offenbart unter P08263 (Mensch), P24472 (Maus), P04904 (Ratte). Als Fusionspartner für die ersten 142 C-terminalen Aminosäuren des Zyxin können neben der Glutathion-S-Transferase auch beispielsweise Hexahistidin, Thioredoxin oder Maltosebindeprotein verwendet werden.

30

Ein Verfahren zur Identifizierung einer chemischen Verbindung, welche eine Wechselwirkung zwischen einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne und einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne modulieren, wird in einer bevorzugten Ausführungsform mittels einer

Oberfläche durchgeführt, die aus einem festen Körper besteht, der mit Domänen bzw. Proteinen wie vorstehend beschrieben beschichtet ist, und den Teil einer Mikrotiterplatte bildet.

- 5 Zur Durchführung des Verfahrens der vorliegenden Erfindung zum spezifischen Nachweis der EVH1-Bindedomäne, einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne, der EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne können monoklonale oder polyklonale Antikörper verwendet werden. Diese monoklonalen oder polyklonalen Antikörper müssen Bindespezifität für eine EVH1-Bindedomäne,
 10 ein Protein mit einer EVH1-Bindedomäne, eine EVH1-Domäne, ein Protein mit einer EVH1-Domäne oder ein mit diesen Domänen oder Proteinen fusioniertes oder chemisch gekoppeltes Antigen aufweisen.

- Zur erfindungsgemäßen Durchführung des Verfahrens wird in einer bevorzugten Ausführungsform ein monoklonaler Antikörper verwendet, der Bindespezifität für
 15 VASP oder Zyxin hat. Solch ein Antikörper kann mittels Hybridomzellen synthetisiert und anschließend konzentriert und gereinigt werden. Die Kultivierung von Hybridomzellen, die Produktion von Antikörpern mit Hilfe von Hybridomzellen, deren Reinigung und Konzentrierung erfolgt nach Standardmethoden wie
 20 beispielsweise in „Current Protocols in Immunology, ed.: J. E. Coligan, Wiley-Interscience (1991)“ beschrieben. Ebenso sind aus diesem Lehrbuch Verfahren zu entnehmen, die es ermöglichen, die Bindespezifität für ein Antigen zu bestimmen. Als Antigen kann für die Zwecke der Verfahren der vorliegenden Erfindung eine EVH1-Bindedomäne oder ein Protein mit einer EVH1-Bindedomäne beispielsweise
 25 Zyxin oder ein Zyxinderivat sowie eine EVH1-Domäne oder ein Protein mit einer EVH1-Domäne beispielsweise VASP oder ein VASP-Derivat oder ein mit diesen Domänen oder Proteinen fusioniertes Antigen wie beispielsweise Glutathion-S-Transferase, Hexahistidin, Thioredoxin oder Maltosebindprotein oder ein chemisch gekoppeltes Antigen eingesetzt werden. Zur erfindungsgemäßen Durchführung des
 30 Verfahrens wird in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ein polyklonaler Antikörper verwendet, der Bindespezifität für eine EVH1-Bindedomäne, ein Protein mit einer EVH1-Bindedomäne wie beispielsweise Zyxin oder ein Zyxinderivat, eine EVH1-Domäne oder ein Protein mit einer EVH1-Domäne wie beispielsweise VASP oder ein VASP-Derivat oder ein mit diesen Domänen oder Proteinen fusioniertes

Antigen wie beispielsweise Glutathion-S-Transferase, Hexahistidin, Thioredoxin oder Maltosebindeprotein oder ein chemisch gekoppeltes Antigen hat. Herstellung, Reinigung, Test und Verwendung polyklonaler Antikörper ist in „Current Protocols in Immunology, ed.: J. E. Coligan, Wiley-Interscience (1991)“ detailliert beschrieben.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens der vorliegenden Erfindung wird als Antikörper mit Bindespezifität für VASP der monoklonale Antikörper mAB IE245 und in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der monoklonale Antikörper mAB IE273 verwendet.

10

Die Antikörper, welche Antikörper des Verfahrens der vorliegenden Erfindung mit Bindespezifität für eine EVH1-Bindedomäne, ein Protein mit einer EVH1-

Bindedomäne, eine EVH1-Domäne, ein Protein mit einer EVH1-Domäne oder ein mit diesen Domänen oder Proteinen fusioniertes oder chemisch gekoppeltes Antigen

15 spezifisch binden, können mit einer biochemisch oder physikalisch chemisch nachweisbaren Markierung versehen sein. Eine biochemisch oder physikalisch chemisch nachweisbare Markierung ist beispielsweise ein Enzym, ein radioaktives Isotop oder eine Fluoreszenzmarkierung. In einer bevorzugten Ausführungsform wird als biochemisch oder physikalisch chemisch nachweisbare Markierung insbesondere

20 alkalische Phosphatase oder β -Galaktosidase, in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird als biochemisch oder physikalisch chemisch nachweisbare Markierung ein Isotop wie beispielsweise ein radioaktives Isotop und in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird als biochemisch oder physikalisch

25 chemisch nachweisbare Markierung eine Fluoreszenzmarkierung insbesondere ein Lanthanidkomplex wie ein Europium-Komplex verwendet.

Ein wie vorstehend beschriebenes Verfahren dieser Erfindung kann in einer bevorzugten Ausführungsform zur Identifizierung eines Arzneimittels verwendet werden. Solche Arzneimittel können unter anderem zur Behandlung von Herz-

30 Kreislauferkrankungen, inflammatorischen Erkrankungen, Erkrankungen der Blutgefäße oder bei neoplastischen Zell- und Gewebsveränderungen wie beispielsweise Krebs verwendet werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine chemische Verbindung zur Modulierung der Wechselwirkung zwischen einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne und einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne, welche über ein Verfahren der vorliegenden Erfindung, wie vorstehend

5 beschrieben, identifiziert wurde. Solche chemischen Verbindungen sind bevorzugt Peptide insbesondere mit den Sequenzen FPPPP oder WPPPP oder deren chemische Derivate und prolinreichen Homologe. Solche chemischen Verbindungen können beispielsweise Arzneimittel zur Behandlung von Herz-

10 Kreislauferkrankungen, inflammatorischen Erkrankungen, Erkrankungen der Blutgefäße oder von neoplastischen Zell- und Gewebsveränderungen wie beispielsweise Krebs sein.

Die Erfindung bezieht sich in einer bevorzugten Ausführungsform auf den monoklonalen Antikörper mAB IE245, der Bindspezifität für VASP hat, sowie

15 Hybridomazellen, welche den monoklonalen Antikörper mAB IE245 produzieren können. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform bestehen die Hybridomazellen, welche den monoklonalen Antikörper mABIE245 produzieren können, aus dem Stamm DSM ACC2444. Die Erfindung bezieht sich in einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform auf den monoklonalen Antikörper mAB

20 IE273, der Bindspezifität für VASP hat, sowie auf Hybridomazellen, welche den monoklonalen Antikörper mAB IE273 produzieren können. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform bestehen die Hybridomazellen, welche den monoklonalen Antikörper mABIE273 produzieren können, aus dem Stamm DSM

ACC2445.

25 Die Hybridomazellen DSM ACC2444 und DSM ACC2445 sind bei der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen hinterlegt.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Oberfläche, die aus einem festen Körper besteht, und mit einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne oder mit einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne beschichtet ist.

30

Das Protein mit einer EVH1-Bindedomäne besteht dabei bevorzugt aus Zyxin oder einem Zyxinderivat. Das Zyxinderivat wird weiterhin bevorzugt aus einem

Fusionsprotein aus Zyxin oder einem Zyxinfragment und einer Glutathion-S-Transferase oder aus Zyxin oder einem Zyxinfragment und einem Maltose-Bindeprotein oder aus Zyxin oder einem Zyxinfragment und Hexahistidin gebildet. Das Protein, welches eine EVH1-Domäne hat, ist bevorzugt VASP oder ein VASP-

5 Derivat oder ein Fusionsprotein aus VASP oder einem VASP-Fragment und Glutathion-S-Transferase oder Maltose-Bindeprotein oder Hexahistidin.

In einer bevorzugten Ausführungsform wechselwirkt die EVH1-Bindedomäne oder das Protein mit einer EVH1-Bindedomäne mit einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne. Zur Herstellung dieser Wechselwirkung werden
10 bezüglich der Proteine mit einer EVH1-Bindedomäne bevorzugt Zyxin oder ein Zyxinderivat beispielsweise gebildet als Fusionsprotein zwischen Zyxin oder einem Zyxinfragment und Glutathion-S-Transferase oder Zyxin oder einem Zyxinfragment und Maltose-Bindeprotein verwendet werden. Bezüglich der Proteine mit einer EVH1-Domäne wird bevorzugt VASP oder ein VASP-Derivat oder ein Fusionsprotein
15 aus VASP oder einem VASP-Fragment und Glutathion-S-Transferase oder Maltose-Bindeprotein eingesetzt.

Als VASP oder VASP-Derivat, Zyxin oder Zyxinderivat können grundsätzlich die entsprechenden Proteine oder deren Teile aus jeder Spezies eingesetzt werden. Bevorzugt werden VASP und Zyxin oder Teile davon von Wirbeltieren wie der Maus
20 und besonders bevorzugt die des Menschen verwendet. Aminosäuresequenzen für VASP sind offenbart bei Swissprot unter P50552 (Mensch) oder bei EMBL unter X98475.1 (Maus). Aminosäuresequenzen für Zyxin sind offenbart bei Swissprot unter Q15942 (Mensch) oder unter Q62523 (Maus).

25 Die Erfindung betrifft darüberhinaus eine Mikrotiterplatte, welche eine Oberfläche enthält, die mit einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne und einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne insbesondere mit Zyxin, einem Zyxinderivat oder VASP oder einem VASP-Derivat beschichtet ist. Die Mikrotiterplatte kann dabei unterschiedlich viele Gefäße
30 umfassen. Beispielsweise kann die Mikrotiterplatte 3, 6, 12, 24, 48, 96, 192, 384, 768, 1536, 3072 oder mehr Gefäße (wells) enthalten. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Mikrotiterplatte 384 Gefäße, in einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält sie 768 Gefäße und in einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform enthält die Mikrotiterplatte 1536 Gefäße. Die

Oberfläche der vorstehenden Erfindung in den beschriebenen Ausführungsformen kann darüberhinaus Bestandteil von anderen Geräten, Gefäßen oder Vorrichtungen wie beispielsweise von Eppendorfgläsern, Röhrchen aus unterschiedlichem Material insbesondere Kunststoff oder Glas, von chipartigen Vorrichtungen oder
 5 anderen Geräten, Vorrichtungen oder Behältern sein.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Identifizierung von chemischen Verbindungen, welche eine Wechselwirkung zwischen einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne und einer EVH1-Domäne oder
 10 einem Protein mit einer EVH1-Domäne modulieren können, enthaltend die Verfahrensschritte:

- a) In-Kontakt-Bringen einer EVH1-Bindedomäne oder eines Protein mit einer EVH1-Bindedomäne mit einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne in Gegenwart mindestens einer zu untersuchenden
 15 chemischen Verbindung, wobei an die EVH1-Bindedomäne oder ein Protein mit einer EVH1-Bindedomäne und/oder die EVH1-Domäne oder ein Protein mit einer EVH1-Domäne jeweils ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, der einen Energietransfer zwischen einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne und einer EVH1-Domäne oder einem Protein
 20 mit einer EVH1-Domäne ermöglicht;
- b) Spektroskopische Bestimmung nach Inkubation gemäß a).


In diesem Verfahren werden als Fluoreszenzfarbstoff bevorzugt APC, Cy5, oder ein Lanthanidkomplex hierbei insbesondere ein Europium-Komplex verwendet.
 25 Als Protein mit einer EVH1-Domäne in diesem Verfahren wird bevorzugt VASP oder ein VASP-Derivat verwendet. Als Protein mit der EVH1-Bindedomäne wird bevorzugt Zyxin oder ein Zyxinderivat verwendet. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird als Zyxinderivat ein Fusionsprotein von Zyxin oder einem Zyxinfragment mit einer Glutathion-S-Transferase oder von Zyxin oder einem
 30 Zyxinfragment mit Maltose-Bindeprotein eingesetzt.

Die Wechselwirkung zwischen einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne insbesondere VASP oder einem VASP-Derivat und zwischen einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne insbesondere Zyxin oder einem Zyxinderivat kann spektroskopisch bestimmt

werden, wenn man an eine EVH1-Domäne oder ein Protein mit einer EVH1-Domäne insbesondere VASP oder ein VASP-Derivat und an eine EVH1-Bindedomäne oder ein Protein mit einer EVH1-Bindedomäne insbesondere Zyxin oder ein Zyxinderivat bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe koppelt. Diese Fluoreszenzfarbstoffe ermöglichen


5 einen Energietransfer, wenn sie durch Komplexbildung der an sie gekoppelten Proteine in ausreichend enge räumliche Nachbarschaft gebracht werden. Als Fluoreszenzfarbstoffe können Verbindungen eingesetzt werden, die komplementär als Energiedonor und Energieakzeptor wirken. Der Energiedonor wird mittels einer elektromagnetischen Strahlung bestimmter Wellenlänge in einen angeregten

10 Zustand versetzt. Die Anregungsenergie kann strahlungslos auf den Energieakzeptor übertragen werden, wenn sich dieser in enger Nachbarschaft zum Energiedonor aufhält. Der Energieakzeptor wird unter Abgabe einer

 elektromagnetischen Strahlung bestimmter Wellenlänge wieder in seinen Grundzustand versetzt. Diese Energieabgabe findet bei einer anderen Wellenlänge

15 statt als die Anregung des Energiedonors. Bei entsprechender Wahl von Energiedonor und Energieakzeptor erfolgt der Energietransfer bei spektroskopisch bestimmaren Wellenlängen elektromagnetischer Strahlung, bevorzugt im Bereich des sichtbaren Lichts. Koppelt man Energiedonor und Energieakzeptor an eine EVH1-Domäne oder ein Protein mit einer EVH1-Domäne insbesondere VASP oder

20 ein VASP-Derivat und eine EVH1-Bindedomäne oder ein Protein mit einer EVH1-Bindedomäne insbesondere Zyxin oder ein Zyxinderivat, dann kann die Wechselwirkung dieser Proteine oder Proteinderivate direkt spektroskopisch bestimmt werden. Eine zu untersuchende chemische Verbindung, welche die

 Wechselwirkung einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne und einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne

25 modifiziert, gibt sich durch eine spektroskopisch nachweisbare Änderung im Energietransfer zu erkennen, sobald sie mit den wechselwirkenden Proteinen in Kontakt gebracht wird. Als Energiedonor können bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe wie beispielsweise Lanthanid-Komplexe insbesondere Europium-Komplexe

30 verwendet werden. Als Energieakzeptor können bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe wie APC oder Cy5 eingesetzt werden. Jeder Energiedonor oder Energieakzeptor kann an die EVH1-Domäne oder ein Protein mit einer EVH1-Domäne insbesondere VASP oder ein VASP-Derivat oder eine EVH1-Bindedomäne oder ein Protein mit einer EVH1-Bindedomäne insbesondere Zyxin oder Zyxinderivat gekoppelt sein. Bei

der Durchführung des Verfahrens der vorliegenden Erfindung ist darauf zu achten, daß die wechselwirkenden Domänen bzw. die wechselwirkenden Proteine, welche die unterschiedlichen Domänen enthalten, jeweils komplementär entweder mit Energiedonor oder Energieakzeptor versehen sind. Die spektroskopische

- 5 Bestimmung der Wechselwirkung erfordert, daß Energiedonor und Energieakzeptor gleichzeitig in dem die Wechselwirkung vermittelnden molekularen Komplex vorhanden sind.

Die Kopplung von Energiedonor oder Energieakzeptor kann jeweils direkt über kovalente Bindungen oder indirekt vermittelt über Antikörper oder Biotin-Streptavidin
10 hergestellt werden. Solche Antikörper sind kommerziell erhältlich.

Als VASP oder VASP-Derivat, Zyxin oder Zyxinderivat können grundsätzlich die entsprechenden Proteine oder deren Teile aus jeder Spezies eingesetzt werden. Bevorzugt werden VASP und Zyxin oder Teile davon von Wirbeltieren wie der Maus
15 und besonders bevorzugt die des Menschen verwendet. Aminosäuresequenzen für VASP sind offenbart bei Swissprot unter P50552 (Mensch) oder bei EMBL unter X98475.1 (Maus). Aminosäuresequenzen für Zyxin sind offenbart bei Swissprot unter Q15942 (Mensch) oder unter Q62523 (Maus).

- 20 Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Modulierung der Wechselwirkung zwischen einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH-1 Bindedomäne und einer EVH-1 Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne, wobei eine Verbindung mittels
25 eines Verfahrens gemäß einem oder mehreren dieser Erfindung identifiziert wird, mit pharmazeutischen Hilfsstoffen und/oder pharmazeutischen Trägern versetzt wird und anschließend gegebenenfalls in eine pharmazeutische Darreichungsform gebracht wird.

Beispiele

30

Beispiel 1: Bestimmung der Wechselwirkung von VASP und Zyxin oder einem Zyxinderivat mittels eines Festphasen-Assays (DELFI A)

Beim Festphasen-Assay wird ein Bindungspartner (VASP oder Zyxin) auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte (MTP) immobilisiert (=Beschichtung). Nach dem Blocken der ungesättigten Bindungsstellen auf der Plastikoberfläche wird mit dem jeweiligen anderen Bindungspartner inkubiert. In einem Waschschrift wird das überschüssige, nicht gebundene Protein nach der Inkubation entfernt. Durch geeignete Antikörper kann jetzt das spezifisch gebundene Protein detektiert und quantifiziert werden. Hierbei kann die Verwendung von Lanthanid-Chelaten als Fluoreszenz-Markierung für die Antikörper und die Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenz erheblich zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses (S/N) beitragen.

Für den Festphasenassay wurden zuerst die besten Beschichtungs- und Inkubationsbedingungen charakterisiert. Es stellte sich heraus, daß sich die Zyxin-Komponente (GST-Zyxin(1-142) oder Zyxin(1-142)) zum Beschichten der Mikrotiterplatten (MTP) sehr gut eignet. Für die Detektion des spezifisch an das immobilisierte Zyxin gebundenen VASP eignen sich monoklonale Antikörper gegen VASP, welche ihrerseits mittels Lanthanid-markierten Antikörpern gegen Maus IgGs nachgewiesen werden können (Wallac: DELFIA anti-Mouse-Eu(N1)).

Das gegenwärtige Assay-Protokoll besteht aus 5 Inkubationsritten und 3 Waschsritten:

1. Inkubation der leeren MTPs mit GST-Zyxin(1-142) (Beschichtung)
2. Blocken mit BSA (Rinderserumalbumin)
3. Waschen mit PBS (Waschpuffer)
4. Inkubation mit VASP (Ligand) (mit und ohne Testsubstanzen)
5. Waschen mit PBS
6. Inkubation mit Detektionsmix: α -VASP (= monoklonaler anti-VASP Antikörper) + α -Maus-Eu (= Europium markierter anti-Maus Antikörper von Wallac)
7. Waschen mit DELFIA-Wash-Lösung
8. Freisetzung des gebundenen Lanthanidkomplexes und fluorimetrische Messung.

Bei der Wahl der Reagenzien/Proteine stellte sich heraus, daß das rekombinante humane VASP Protein mit der vollständigen Aminosäuresequenz gewonnen aus

Insektenzellen (baculo VASP) mit signifikant besserem Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) funktionierte als VASP oder VASP-Domänen, welche in *E. coli* expremiert und daraus gewonnen wurden.

5 Beispiel 2: Eigenschaften des VASP Zyxin Festphasen (DELFI) Assays:

Die optimalen Bedingungen für Beschichtung (GST-Zyxin(1-142)) und Liganden-Inkubation (VASP) wurden durch Titration der Reagenzien ermittelt. Die Beschichtung der MTPs mit GST-Zyxin(1-142) ist bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ der Beschichtungslösung in der Sättigung (Fig. 1a). Das eingesetzte Volumen pro Well hängt vom gewählten MTP-Format ab (50 μl oder 100 μl bei 96-well Platten, 20 μl bei 384-well Platten). Für die Inkubation mit VASP als Ligand ergab sich ebenfalls eine Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ als Wert mit dem besten S/N (Fig. 1b).

15 Beispiel 3: Detektion

Bei der weiteren Optimierung des Assays stellte man fest, daß die Wahl des monoklonalen Antikörpers für die Detektion des gebundenen VASPs von großer Bedeutung ist. Im Vergleich mit dem anti-VASP Antikörper mAB IE245 erreicht man mit dem Antikörper IE273 ein S/N, das um ca. eine Größenordnung besser ist. Die Optimierung der einzusetzenden Menge an IE273 Antikörper zeigte, daß diese abhängig von der vorher verwendeten Menge an VASP ist. Ein Optimum für S/N ergab sich für ein molares Verhältnis von IE273 zu VASP bei einem Wert von 1:16 (massenmäßiges Verhältnis von 1:4). Bei Inkubation mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ VASP ergab sich das beste Signal bei einer Detektion mit 1,25 $\mu\text{g/ml}$ IE273. Dies ist auch von Bedeutung für die Optimierung bzw. Reduzierung der Waschschrte, da es zeigt, daß der Waschschrte zwischen Inkubation mit VASP und Detektion wichtig ist und nicht weggelassen werden darf.

30 Beispiel 4: Kompetitionsversuche mit peptidergen Inhibitoren

Für die VASP-Zyxin-Wechselwirkung existieren bislang noch keine bekannten nicht-peptidergen Inhibitoren. Um die Wirkung potenzieller Inhibitoren zu simulieren, wurden Inhibitionsversuche mit kompetierenden Peptiden unternommen, die das

VASP-Bindungsmotiv von Zyxin (FPPPP) enthielten. In früheren Arbeiten (Niebuhr et al. (1997) EMBO J. 16, 5433) wurden Mutationen in diesem Motiv und ihre Wirkung auf die Inhibition der VASP-ActA-Wechselwirkung untersucht, die ebenfalls auf der Bindung von VASP an FPPPP-Motive in ActA beruht. Dabei wurde gezeigt, daß im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz FPPPP Peptide mit einem APPPP-Motiv eine deutlich schlechtere Inhibition zeigten, wogegen Peptide mit einem WPPPP-Motiv sogar eine bessere Inhibition als das Wildtyp-Motiv aufwiesen (Inhibition: WPPPP > FPPPP > APPPP). Zyxinpeptide mit entsprechenden Mutationen wurden zur Kompetition der VASP-Zyxin-Wechselwirkung eingesetzt. Dabei ergab sich die gleiche Reihenfolge in bezug auf die apparenten Inhibitionskonstanten der Peptide wie für die VASP-ActA-Wechselwirkung (Fig. 2): WPPPP > FPPPP > APPPP. Dies zeigt, daß es möglich ist, durch kompetierende Substanzen, und möglicherweise auch durch anders geartete Inhibitoren, die VASP-Zyxin Wechselwirkung zu beeinflussen und dies durch den beschriebenen Assay zu detektieren.

Beispiel 5: Lösungsmittel Toleranzen

Um den Einsatz des Assays im HTS zu gewährleisten, muß sichergestellt sein, daß der Assay über eine ausreichende Toleranz gegenüber den Standardlösungsmitteln der Substanzbibliotheken verfügt. In der Regel sind diese Dimethylsulfoxid (DMSO) und Methanol. Um die Toleranz des Assays gegenüber diesen beiden Lösungsmitteln zu testen, wurde bei konstanter Beschichtung und konstanter Ligandenkonzentration (VASP) mit steigenden Konzentrationen Methanol und DMSO inkubiert. Es zeigte sich, daß Methanol bis zu einer Konzentration von 25% praktisch keinen Einfluß auf den Assay hat (Fig. 3a), während das Signal bei 25% DMSO fast um die Hälfte reduziert wurde (Fig. 3b). Bei im Screening gebräuchlichen DMSO-Konzentrationen von 1-5% betrug die Verringerung des Signals jedoch nur bis zu 15%, was im Rahmen eines HTS-Assay tragbar ist.

30

Beispiel 6: Miniaturisierung

In der oben beschriebenen Weise wurden die Assays zunächst in 96-well Platten

durchgeführt. Dabei konnte das Assayvolumen von 100 µl pro Well auf 50 µl reduziert werden.

5 Zur weiteren Miniaturisierung des Assays für den Einsatz im HTS wurde der Assay auf 384-well Platten angepaßt. Dazu wurden 384-well Platten verschiedener Hersteller mit unterschiedlichen Oberflächen und Farben getestet. Unter den getesteten Platten ergaben sich die besten Werte für die 384-well Platten von Greiner. Dabei verhielten sich die weißen und schwarzen Platten sehr ähnlich, auch wenn die schwarzen Platten einen besonders niedrigen Hintergrund hatten. Unter 10 den getesteten Oberflächen (low binding, untreated, high-binding) wurden die besten Ergebnisse mit den unbehandelten Oberflächen (untreated) erzielt.

Durch die Verwendung von 384-well Platten konnte das Assayvolumen weiter auf 20 µl pro Well reduziert werden. Erfreulicherweise ergab sich als zusätzlicher Effekt der Miniaturisierung eine weitere Verbesserung des S/N auf ca. 100.

15

Beispiel 7: Übersicht: Assay Protokoll (für 384-well Platten)

| | | | |
|-----------|--|---------------|----------------|
| 1. | Beschichtung der Platten (Coating): | 20 µl | 1 hr RT |
| | GST-Zyxin(1-142) in PBS 5 µg/ml | | |
| 2. | Blocken | 100 µl | 1 hr RT |
| | 15% BSA in PBS | | |
| 3. | Waschen | 3x | 100 µl |
| | PBS | | |
| 4. | Inkubation mit VASP | 20 µl | 1 hr RT |
| | VASP in DELFIA-Assay Puffer 5 µg/ml | | |
| 5. | Waschen | 3x | 100 µl |

| | | | |
|----|---|-------|---------|
| | PBS | | |
| 6. | Detektion | 20 µl | 1 hr RT |
| | α-VASP (IE273): 1,25 µg/ml α-Maus-Eu(N1): 50 ng/ml in DELFIA-Assay Puffer | | |
| 7. | Waschen | 3x | 100 µl |
| | DELFIA-Wasch-Puffer | | |
| 8. | Enhancement | 50 µl | 15 min. |
| | DELFIA-Enhancement Lösung | | |

Beispiel 8: Homogener Assay mittels Energietransfer bei fluoreszenzmarkiertem VASP und Zyxin oder einem Zyxinderivat:

5

Für den homogenen Assay wurde humanes VASP mit vollständiger Aminosäuresequenz, isoliert aus Insektenzellen (SF21), eingesetzt und über spezifische Antikörper indirekt mit einer Fluoreszenzmarkierung versehen. Als Bindungspartner wurden zunächst Peptide mit dem VASP-Bindungsmotiv FPPPP verwendet, die über ein gekoppeltes Biotin ebenfalls an den anderen Fluorophor für den Energietransfer (Streptavidin-APC) binden konnten. In folgenden Experimenten wurde dann jedoch dazu übergegangen, anstelle von Peptiden ein GST-Fusionsprotein mit dem N-Terminus von Zyxin (GST-Zyxin(1-142)), welches mehrere dieser FPPPP-Motive enthält, als Bindungspartner für VASP zu verwenden.

15 Hierzu wurde GST-Zyxin(1-142) in E. coli exprimiert, aufgereinigt und mit Biotinen kovalent modifiziert. Damit kann ein Energietransfer zwischen den fluoreszenzmarkierten Bindungspartnern gemessen werden.

Beispiel 9: Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1a: Beschichtung der MTPs mit GST-Zyxin(1-142): Bei einer Konzentration von 5 µg/ml der Beschichtungslösung ist Sättigung erreicht.

5

Fig 1b: Beschichtung der MTPs mit VASP: Für die Inkubation mit VASP als Ligand ergab sich eine Konzentration von 5 µg/ml als Wert mit dem besten S/N.

- 10 Fig.2: Inhibition der VASP-Zyxin-Wechselwirkung durch kompetierende Peptide, die das APPPP-, FPPPP-, oder WPPPP-Motiv enthalten.



Fig. 3a: Feststellung der Toleranz gegen Methanol; Inkubation mit steigenden Konzentrationen von Methanol bei konstanter Beschichtung und konstanter

- 15 Ligandenkonzentration (VASP); Methanol zeigt bis zu einer Konzentration von 25% praktisch keinen Einfluß auf den Assay.

Fig. 3b: Feststellung der Toleranz gegen DMSO; Inkubation mit steigenden Konzentrationen von DMSO bei konstanter Beschichtung und konstanter

- 20 Ligandenkonzentration (VASP); DMSO bewirkt bei 25% eine Reduktion des Signals um annähernd die Hälfte.



Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung einer chemischen Verbindung, welche eine Wechselwirkung zwischen einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne und einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne moduliert, enthaltend die Verfahrensschritte:
 - a) In-Kontakt-Bringen einer EVH1-Bindedomäne oder eines Proteins mit einer EVH1-Bindedomäne, welches mit einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne wechselwirkt, mit einer zu untersuchenden chemischen Verbindung;
 - b) Verwendung des Ansatzes gemäß a) zur Inkubation mit einem Antikörper, der Bindspezifität für eine EVH1-Bindedomäne oder ein Protein mit einer EVH1-Bindedomäne oder eine EVH1-Domäne oder ein Protein mit einer EVH1-Domäne oder ein mit diesen Domänen oder Proteinen fusioniertes oder chemisch gekoppeltes Antigen hat;
 - c) Verwendung des Ansatzes gemäß b) zur Inkubation mit einem Antikörper, der den Antikörper aus Ansatz b) spezifisch binden kann und an dem eine biochemisch oder physikalisch chemisch nachweisbare Markierung angebracht ist;
 - d) biochemischer oder physikalisch chemischer Nachweis der Markierung am Antikörper aus c) nach Inkubation gemäß c).
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das In-Kontakt-Bringen mit einer chemischen Verbindung gemäß Verfahrensschritt a) an einer Oberfläche erfolgt, die aus einem festen Körper besteht und einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne beschichtet ist, wobei diese EVH1-Bindedomäne bzw. das Protein mit der EVH1-Bindedomäne mit einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne wechselwirkt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das In-Kontakt-Bringen mit einer chemischen Verbindung gemäß Verfahrensschritt a) an einer Oberfläche erfolgt, die aus einem festen Körper besteht und mit einer EVH1 Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne beschichtet ist, wobei diese EVH1-Domäne

oder das Protein mit der EVH1-Domäne mit einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne wechselwirkt.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei die Oberfläche, die aus einem festen Körper besteht, den Teil einer Mikrotiterplatte bildet.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, wobei als Protein mit einer EVH1-Domäne VASP oder ein VASP-Derivat verwendet wird.
- 10 6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das VASP eines Wirbeltiers verwendet wird.
7. Verfahren nach Anspruche 5, wobei humanes VASP verwendet wird
8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, wobei als Protein mit einer EVH1-Bindedomäne ein Zyxin oder ein Zyxinderivat verwendet wird.
- 15 9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei als Zyxinderivat ein Fusionsprotein verwendet wird, welches aus Zyxin oder einem Zyxinfragment und einer Glutathion-S-Transferase oder aus Zyxin oder einem Zyxinfragment und einem Maltose-Bindeprotein besteht.
- 20 10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9 wobei das Zyxin eines Wirbeltiers verwendet wird.
11. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, wobei humanes Zyxin verwendet wird.
12. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, wobei zur Inkubation gemäß Verfahrensschritt b) ein polyklonaler Antikörper verwendet wird.
- 30 13. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, wobei zur Inkubation gemäß Verfahrensschritt b) ein monoklonaler Antikörper verwendet wird, der mittels Hybridomazellen synthetisiert wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei als monoklonaler Antikörper mAB IE245 verwendet wird.
- 5 15. Verfahren nach Anspruch 13, wobei als monoklonaler Antikörper mAB IE273 verwendet wird.
- 10 16. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 15, wobei zur Inkubation gemäß Verfahrensschritt c) ein Antikörper verwendet wird, bei dem die biochemisch oder physikalisch chemisch nachweisbare Markierung ein radioaktives Isotop, ein Fluoreszenzfarbstoff oder ein Enzym ist.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei ein Antikörper verwendet wird, bei dem das Enzym eine alkalische Phosphatase oder β -Galaktosidase ist.
- 15 18. Verfahren nach Anspruch 16, wobei ein Antikörper verwendet wird, bei dem der Fluoreszenzfarbstoff ein Lanthanid-Komplex ist.
19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei der Lanthanid-Komplex ein Europium-Komplex ist.
- 20 20. Ein Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 19 zur Identifizierung eines Arzneimittels
- 25 21. Eine chemische Verbindung zur Modulierung der Wechselwirkung zwischen einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne und einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne identifizierbar über ein Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 19.
- 30 22. Eine chemische Verbindung nach Anspruch 20, wobei die chemische Verbindung ein Peptid mit einer Sequenz ausgewählt aus den Sequenzen FPPPP oder WPPPP oder deren prolinreiche Homologe oder chemischen Derivaten .

23. Verwendung einer chemischen Verbindung nach Anspruch 21 oder 22 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Herz-Kreislaufkrankungen, inflammatorischen Erkrankungen oder neoplastischen Zell- und Gewebsveränderungen wie Krebs verwendet werden kann.
24. Monoklonaler Antikörper mAB IE245, der Bindspezifität gegen VASP hat.
25. Hybridomazellen DSM ACC2444, welche den monoklonalen Antikörper mAB IE245 produzieren können.
26. Monoklonaler Antikörper mAB IE273, der Bindspezifität gegen VASP hat.
27. Hybridomazellen DSM ACC2445, welche den monoklonalen Antikörper mAB IE273 produzieren können.
28. Oberfläche, die aus einem festen Körper besteht und mit einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne oder mit einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne beschichtet ist.
29. Oberfläche nach Anspruch 28, wobei das Protein, welches eine EVH1-Bindedomäne hat, ein Zyxin oder ein Zyxinderivat ist.
30. Oberfläche nach Anspruch 28 oder 29, wobei das Zyxinderivat ein Fusionsprotein bestehend aus Zyxin oder einem Zyxinfragment und einer Glutathion-S-Transferase oder aus Zyxin oder einem Zyxinfragment und einem Maltose-Bindeprotein ist.
31. Oberfläche nach Anspruch 29 oder 30, wobei das Zyxin eines Wirbeltiers verwendet wird.
32. Oberfläche nach Anspruch 29 oder 30, wobei humanes Zyxin verwendet wird.

33. Oberfläche nach einem oder mehreren der Ansprüche 28 bis 32, wobei die EVH1-Bindedomäne bzw. das Protein mit einer EVH1-Bindedomäne mit einer EVH1-Domäne bzw. einem Protein mit einer EVH1-Domäne wechselwirkt.

5 34. Oberfläche nach Anspruch 28 oder 33, wobei das Protein mit einer EVH1-Domäne ein VASP oder ein VASP-Derivat ist.

35. Oberfläche nach Anspruch 34, wobei das VASP eines Wirbeltiers verwendet wird.

10

36. Oberfläche nach Anspruch 34, wobei humanes VASP verwendet wird.



37. Mikrotiterplatte, welche eine Oberfläche gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 28 bis 36 enthält.

15

38. Verfahren zur Identifizierung von chemischen Verbindungen, welche eine Wechselwirkung zwischen einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne und einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne modulieren können, enthaltend die Verfahrensschritte:

20

a) In-Kontakt-Bringen einer EVH1-Bindedomäne oder eines Protein mit einer EVH1-Bindedomäne mit einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne in Gegenwart mindestens einer zu untersuchenden chemischen Verbindung, wobei an die EVH1-Bindedomäne oder ein Protein mit einer EVH1-Bindedomäne und/oder die EVH1-Domäne oder ein Protein mit einer EVH1-Domäne jeweils ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, der einen Energietransfer zwischen einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne und einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne ermöglicht;

25

c) Spektroskopische Bestimmung nach Inkubation gemäß a).

30

39. Verfahren nach Anspruch 38, wobei als Fluoreszenzfarbstoff APC, Cy5, oder ein Lanthanidkomplex hierbei insbesondere ein Europium-Komplex verwendet wird. .

40. Verfahren nach Anspruch 38 oder 39, wobei das Protein mit einer EVH1-Domäne ein VASP oder ein VASP-Derivat ist.

41. Verfahren nach Anspruch 40, wobei das VASP eines Wirbeltiers verwendet wird.

42. Verfahren nach Anspruch 40, wobei humanes VASP verwendet wird.

10

43. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 38 bis 42, wobei das Protein mit der EVH1-Bindedomäne ein Zyxin oder ein Zyxinderivat ist.



44. Verfahren nach Anspruch 43, wobei das Zyxinderivat ein Fusionsprotein von Zyxin oder einem Zyxinfragment mit einer Glutathion-S-Transferase oder von Zyxin oder einem Zyxinfragment mit Maltose-Bindeprotein ist. [siehe No.9]

15

45. Verfahren nach Anspruch 43 oder 44, wobei das Zyxin eines Wirbeltiers verwendet wird.

20

46. Verfahren nach Anspruch 43 oder 44, wobei humanes Zyxin verwendet wird.

47. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Modulierung der Wechselwirkung zwischen einer EVH1-Bindedomäne oder einem Protein mit einer EVH1-Bindedomäne und einer EVH1-Domäne oder einem Protein mit einer EVH1-Domäne, wobei eine Verbindung mittels eines Verfahrens gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 19 und/oder 38 bis 46 identifiziert wird, mit pharmazeutischen Hilfsstoffen und/oder pharmazeutischen Trägern versetzt wird und anschließend gegebenenfalls in eine pharmazeutische Darreichungsform gebracht wird.



25

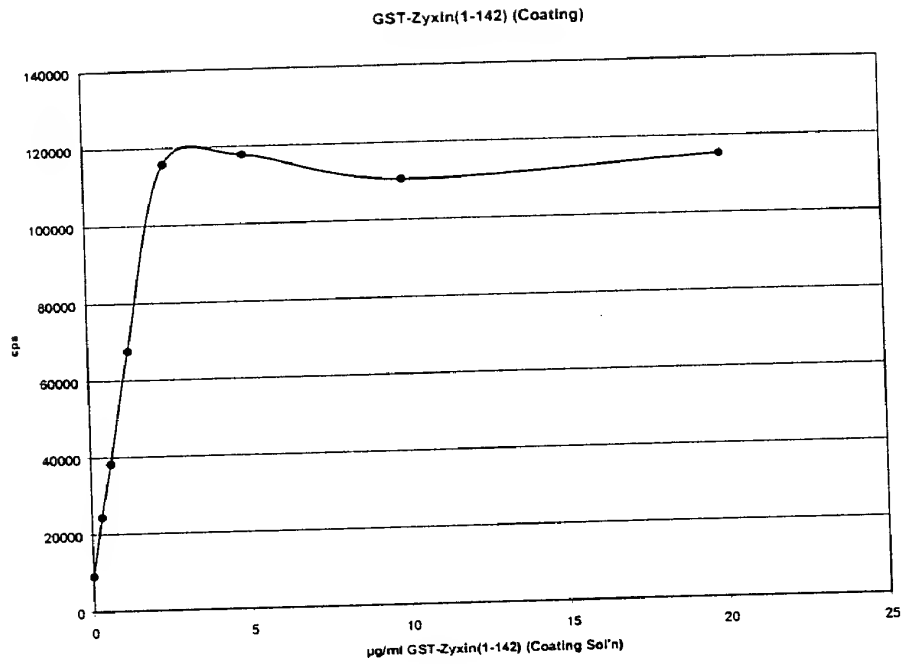
30

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Identifizierung von chemischen Verbindungen, welche die Wechselwirkung zwischen VASP und Zyxin modulieren können. VASP
5 oder ein VASP-Derivat und Zyxin oder ein Zyxinderivat, welche miteinander wechselwirken, werden in Kontakt gebracht mit einer zu untersuchenden chemischen Verbindung. Die Beeinflussung der Wechselwirkung kann mittels Antikörper gegen VASP oder ein VASP-Derivat und /oder Zyxin oder ein Zyxinderivat oder mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierungen an VASP oder einem
10 VASP-Derivat und Zyxin oder einem Zyxinderivat bestimmt werden.

Figuren

Fig. 1 a:



5

Fig. 1 b:

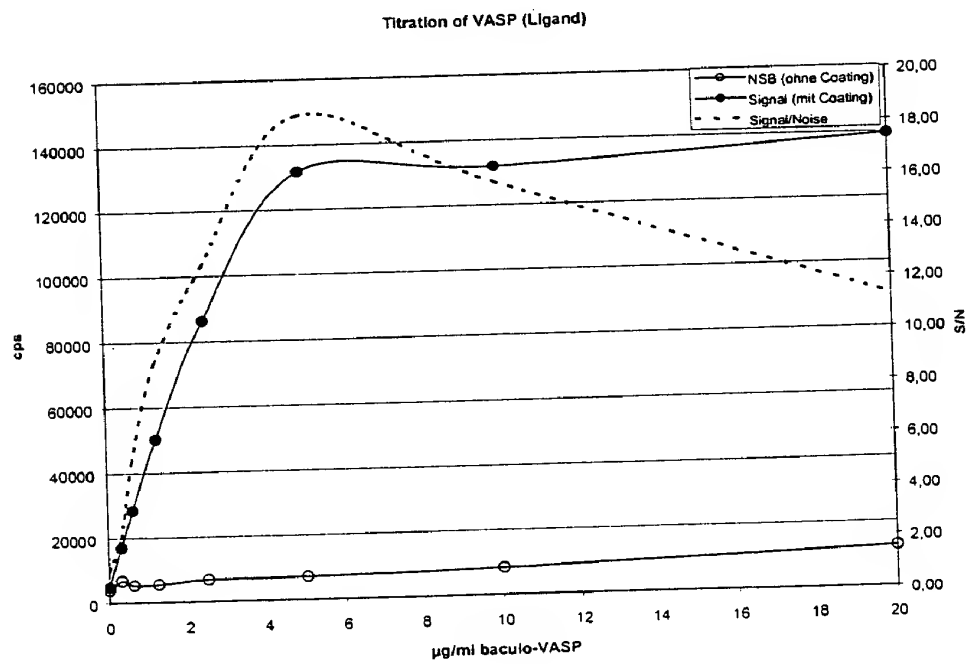


Fig.2:

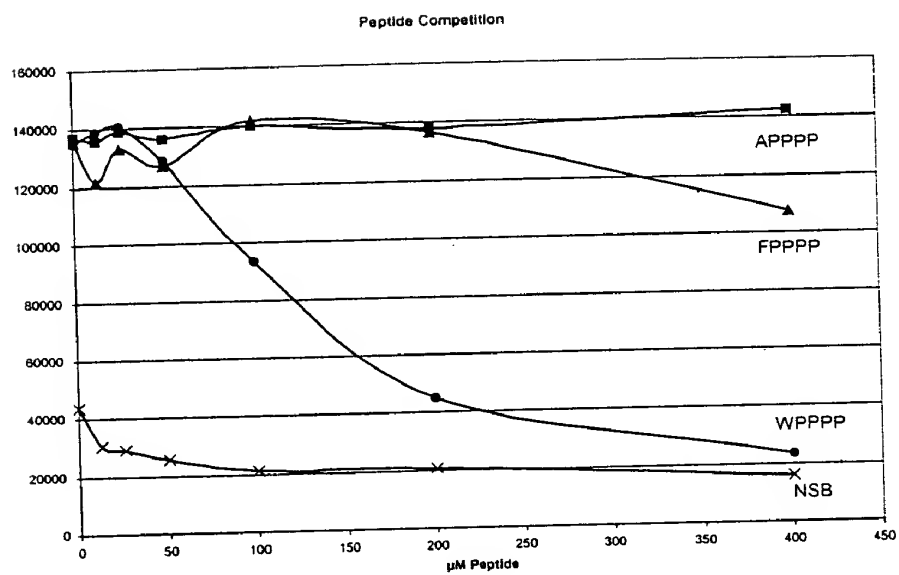
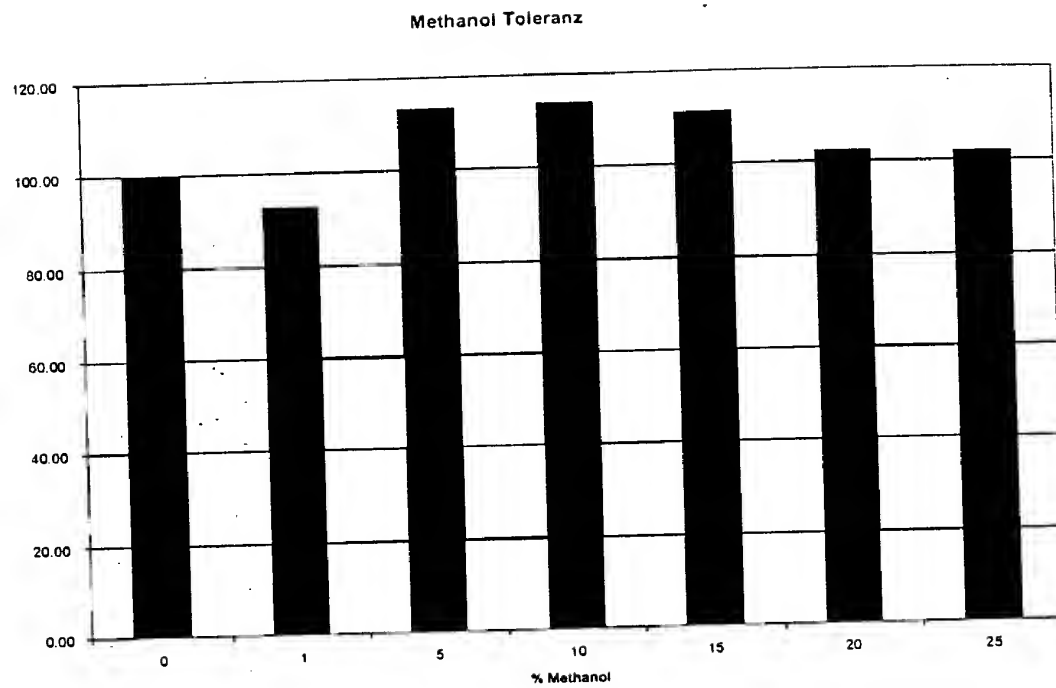


Fig. 3 a:



5

Fig. 3 b:

